

ФАРМАКОГНОЗИЯ И БОТАНИКА

Н.А.Кузьмичева, А.В.Руденко*,
Е.А.Мозолевская

ВЛИЯНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА НАКОПЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ПРОРОСТКАХ ГРЕЧИХИ ПОСЕВНОЙ

Витебский государственный медицинский
университет, *Гимназия №1 г. Витебска

В статье представлены данные о влиянии ионов меди, цинка, марганца, железа и pH раствора на накопление флавоноидов в проростках гречихи посевной. Зависимость содержания флавоноидов от концентрации микроэлементов выражается двухвершинной кривой. Стимулирующий эффект ионов железа проявляется в концентрации 10^{-9} М (увеличение содержания на 60%), ионов марганца - в концентрации 10^{-10} М и 10^{-6} М, ионов цинка - в концентрации 10^{-8} М (увеличение на 50%), ионов меди - в концентрации 10^{-10} М (увеличение на 40%).

ВВЕДЕНИЕ

На активность ферментов, участвующих в биосинтезе флавоноидов, могут оказывать влияние многие микроэлементы. Например, во многих работах отмечен стимулирующий эффект кобальта на биосинтез ароматических аминокислот [1,2,3]. Наряду с кобальтом, активатором ДАГФ-синтазы (одного из ферментов биосинтеза ароматических аминокислот) является марганец [5]. Медь входит в качестве кофермента в состав полифенолоксидазы, поэтому ее активность стимулируется введением дополнительных количеств этого микроэлемента [6]. Цинк является коферментом более 200 различных ферментов, в том числе и регулирующих биосинтез фенольных соединений [1]. В большинстве биохимических процессов растительного организма участвуют флавопротеиновые ферменты, в качестве активаторов которых

служат марганец, железо, медь, молибден [3,5].

Сотрудниками Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова были проанализированы лекарственные растения, содержащие флавоноиды, в частности, изучались представители рода *Fagopyrum*, которые являются природными источниками ценных биологически активных веществ – рутина и цианидина, обладающих Р-витаминной активностью.

Изучение распределения и накопления микроэлементов у этой группы растений показало, что они особенно богаты медью и хромом. У представителей рода *Fagopyrum* особенно богаты медью цветки, плоды и листья.

Высокое содержание меди в цветках, плодах и листьях для всех представителей рода *Fagopyrum* можно объяснить тем, что медь, входящая в состав ряда ферментов – регуляторов окислительно-восстановительных реакций, активно участвует во многих биохимических процессах, связанных с поддержанием жизненных функций растений и накоплением биологически активных соединений, в частности, флавоноидов. Продуцирование этих соединений происходит главным образом в соцветиях и листьях. В плодах же медь накапливается в связи с тем, что выполняет особую специфическую роль в формировании и жизнедеятельности всех репродуктивных органов растительного организма независимо от его систематического положения.

Медь непосредственно участвует в биогенезе флавоноидов. Как уже отмечалось, медь входит в состав фермента полифенолоксидазы, а поэтому растения, испытывающие недостаток меди, имеют пониженную полифенолоксидазную активность, что отражается на продуцировании ими фенольных соединений. Медь также активизирует деятельность фермента пероксидазы. Пероксидаза также участвует в биогенезе фенольных соединений. В растительных клетках медь может связываться с флавоноидами и антоцианами в ус-

тойчивые комплексы по месту свободных О-диоксигруппировок. Образование подобных комплексов можно объяснить ингибирующее действие флавоноидов по отношению ко многим окислительным процессам. Окислительные процессы в растениях катализируются тяжелыми металлами, с которыми флавоноиды образуют комплексы, тем самым нейтрализуя их действие. Этим же можно объяснить и антиоксидантные свойства флавоноидов по отношению к аскорбиновой кислоте в присутствии меди.

Оптимальный синтез в организме растений биологически активных соединений наблюдается только при определенных концентрациях и соотношениях микроэлементов в организме и среде.

Существует два принципиально разных способа изучения влияния микроэлементов: 1) полевые опыты с внесением определенных доз микроудобрений в почву или в виде внекорневой подкормки; 2) опыты на проростках, выращиваемых на растворах микроэлементов. Оба способа дают вполне сопоставимые результаты, при этом второй способ значительно быстрее, проще и экономичнее. [1,4]

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния pH растворов и различных концентраций микроэлементов на содержание флавоноидов в проростках гречихи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Гречиха посевная – однолетнее травянистое растение высотой от 15 до 70 см. Стебель прямой, в верхней части ветвистый, ребристый, голый, чаще всего красноватый или фиолетовый. Листья длиной 1,7-6,5 см, желто-зеленые, очередные, сердцевидные со стреловидным основанием и клетчатым раструбом у основания черешков нижних листьев. Нижние листья – длинночерешковые, верхние – почти сидячие.

Цветки обоеполые, мелкие, пахучие, бело-розовые, собраны в кисти. Околоцветник простой, пятираздельный, розовый или белый. Доли его длиной 3-4,5 мм, яйцевидные. Тычинок 8, из них 5 образуют

наружный круг, а 3 составляют внутренний круг. Пестик с 3 столбиками и 3 рыльцами. Плод – орешек, остро-трехгранный, односемянный, длиной 5-7 мм, яйцевидный, коричневый.

Цветет гречиха посевная в июне – июле. Плоды созревают в августе – сентябре.

Происходит из Центральной Азии. В диком виде не известна. В настоящее время ее возделывают на полях как крупяное и медоносное растение почти по всему свету, особенно в Индии, Румынии. В СНГ основные районы культуры в средней полосе России, в Беларуси, на Украине.

В листьях гречихи посевной содержится гликозид рутин. В цветущей траве его содержится до 4 %. Гречиха содержит достаточно много хорошо усваиваемых белков (6-12 %). Водорастворимые белки (альбумины) составляют 58 % общего их количества, а солерастворимые (глобулины и др.) – 28 %.

Кроме того, в гречихе содержится большое количество углеводов (крахмала до 87%), жиров, органических кислот (хлорогеновая, галловая, протокатеховая, кофейная, лимонная, яблочная, щавелевая), клетчатки. Минеральные вещества в гречихе посевной представлены в виде солей железа, кальция, фосфора, меди, цинка, йода, висмута, никеля, кобальта. Имеются также и витамины: А, В₁, В₂, В₆, Е, Р, РР. Пыльца гречихи содержит больше витаминов, чем плоды. Из цветков выделен фагопирин – химическое соединение, которое повышает чувствительность к солнечному свету.

С лечебной целью заготавливают листья, цветки и семена. Сбор сырья проводят во время цветения и по мере созревания семян.

Сушится сырьё на открытом воздухе в тени или на чердаках с хорошей вентиляцией. Допускается также использование сушилок с температурой 30-40 градусов.

Гречиху посевную используют как сырьё для получения рутина, который стабилизирует мембраны эндотелия капилляров. Рутин применяется для профилактики и лечения различных заболеваний, связанных с нарушением проницаемости сосуди-

стой стенки, при геморрагическом синдроме, при кровоизлияниях в сетчатку глаза, ревматизме, глаукоме, сахарном диабете, аллергических заболеваниях, воспалении слизистых оболочек дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта, сыпном тифе, скарлатине, тромбопенической пурпуре, кори. Рутин уменьшает отмирание тканей при обморожениях. Он усиливает защитные свойства организма, поэтому применяется при лучевой болезни.

Фолиевая кислота, которая содержится в гречихе, стимулирует кроветворение.

Настой из свежих листьев и цветков, а также приготовленный из них салат применяют для профилактики и лечения гипо- и авитаминозов, гипертонической болезни. Соком из свежих растений лечат конъюнктивиты, блефариты, гнойные раны и нарывы.

Кроме того, гречиху рекомендуют при аритмии, неврозе, пороках сердца, артритах, полиартритах, гепатите, лейкозах. Ценная особенность гречневой крупы заключается в ее способности хорошо впитывать жир, что используется для питания больных, которые не могут потреблять жиры в чистом виде. Сухая гречневая мука, просеянная через сито, рекомендуется в виде детской присыпки при опрелостях.

В Московском медицинском институте им. И.М. Сеченова в 1982 г. был разработан и запатентован способ получения и очистки рутина из травы гречихи.

Материалом для исследования послужили семена гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench=*F. sagittatum* Gilib.) сорта Смуглянка, проращиваемые в течение 8 суток в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой, разведениями электролизной воды (рН от 5 до 12) или растворами микроэлементов (сульфатов меди, цинка, железа и марганца) в концентрациях от 10^{-2} М до 10^{-12} М.

Содержание флавоноидов определяли спектрофотометрическим методом: 10 проростков из чашки Петри измельчали в ступке, количественно переносили в мерный цилиндр на 10 мл при помощи 7-8 мл этанола, доводили этанолом до 10,0 мл

и тщательно перемешивали. Содержимое переносили в стеклянный флакон, закрывали пробкой и выдерживали в темноте двое суток. Затем из флакона брали 0,1 мл экстракта (не взмучивая осадок) и прибавляли 2,9 мл 0,05 М раствора алюминия хлорида в этаноле, раствор перемешивали и через 40 минут определяли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 410 нм. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 0,1 мл того же экстракта и 2,9 мл этанола. Относительное содержание флавоноидов в проростках гречихи, выращенных на растворах микроэлементов, выражали в процентах по отношению к контролю – содержанию флавоноидов в проростках, выращенных на воде очищенной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всхожесть партии семян, используемых в опытах, составляла 80-100%, причем сроки прорастания варьировали от 3 до 7 суток. В скарификации или каких-либо других дополнительных процедурах, облегчающих прорастание, семена не нуждаются. Для достижения максимальной однородности проростков семян высевали в 2 раза больше, чем было нужно для опыта, а на 3 сутки оставляли в чашках Петри только 12 семян с корешками не менее 3 мм. 10 хорошо развитых проростков использовали для измерения длины и определения содержания суммы флавоноидов.

Объем раствора, необходимый для проращивания семян гречихи, был установлен экспериментально. Выяснилось, что для выращивания 20 семян в течение 3 суток, и 12 семян в течение последующих 5 суток, не допуская их высыхания, достаточно 12 мл раствора. При дальнейшем увеличении объема раствора семена загнивают и плесневеют. Поэтому в дальнейших опытах было использовано 12 мл раствора.

Далее было изучено распределение суммы флавоноидов между корнем, гипокотилем и почечкой. В 12 чашках Петри были выращены проростки, на 8-е сутки они были разделены на части. Содержание флавоноидов определяли отдельно в корнях, гипокотилях и почечках от 10 проростков. Из данных, представленных в таб-

лице 1, видно, что более 90% флавоноидов сосредоточены в почечках. В гипокотильях накапливается всего 2,5% флавоноидов от общей суммы, а в корнях - около 6%.

Результаты изучения динамики роста проростков и накопления в них флавоноидов представлены на рисунках 1 и 2. Кривая роста имеет классическую S-образную форму [2], причем переход на плато наблюдается на 8-е сутки развития. Динамика накопления флавоноидов в целом повторяет кривую роста. Таким образом, продолжительность последующих опытов была определена в 8 суток.

Влияние микроэлементов и ионов водорода на содержание флавоноидов в проростках гречихи изучали в концентрациях от 10^{-2} - 10^{-4} М до 10^{-10} - 10^{-12} М, которые получали путем разведения исходных 10^{-2} М растворов сульфатов меди, цинка, железа и марганца или электролизной воды, накапливающейся у катода (рН=5) и анода (рН=12). Результаты определения содержания флавоноидов в проростках, выращенных на растворах микроэлементов, представлены на рис. 3, 5, 7- 9.

Зависимость содержания флавоноидов от концентрации микроэлементов во всех случаях выражается двухвершинной

кривой. Оба максимума накопления в большинстве случаев выражены приблизительно одинаково, лишь для ионов меди и особенно для ионов железа второй максимум (более низких концентраций) значительно превышает первый. Между максимумами наблюдается прогиб кривой, который соответствует наибольшим размерам проростков, определяемым по длине корней и побегов (рис. 4 и 6).

Изученные микроэлементы в оптимальных концентрациях положительно влияют на накопление флавоноидов в проростках гречихи. Сульфат меди в концентрации 10^{-10} М, сульфат цинка в концентрации 10^{-3} М и 10^{-8} М стимулируют накопление флавоноидов приблизительно на 40%. Сульфат марганца вызывает увеличение накопления флавоноидов на 60% в концентрации 10^{-6} М и 10^{-10} М. Но наибольшим эффектом из изученных микроэлементов отличаются ионы железа. Концентрации выше 10^{-8} М угнетают накопление флавоноидов, зато уменьшение концентрации всего на один порядок приводит к двукратному увеличению содержания флавоноидов в проростках гречихи по сравнению с контролем.

Таблица 1

Содержание флавоноидов в различных частях проростков гречихи (в % от суммы)

№ образца	Почечка	Гипокотиль	Корень
1	94,1	4,5	1,3
2	91,9	3,1	5,0
3	95,9	2,2	1,9
4	90,9	1,8	7,2
5	95,6	1,0	3,3
6	93,1	1,2	5,7
7	92,8	4,3	2,9
8	88,4	1,3	10,3
9	83,7	6,0	10,3
10	88,4	2,6	9,0
11	86,0	1,5	12,6
12	96,1	0,9	3,0
среднее	91,5	2,5	6,0



Рис. 1. Динамика роста проростков гречихи



Рис. 2. Динамика накопления флавоноидов в проростках гречихи

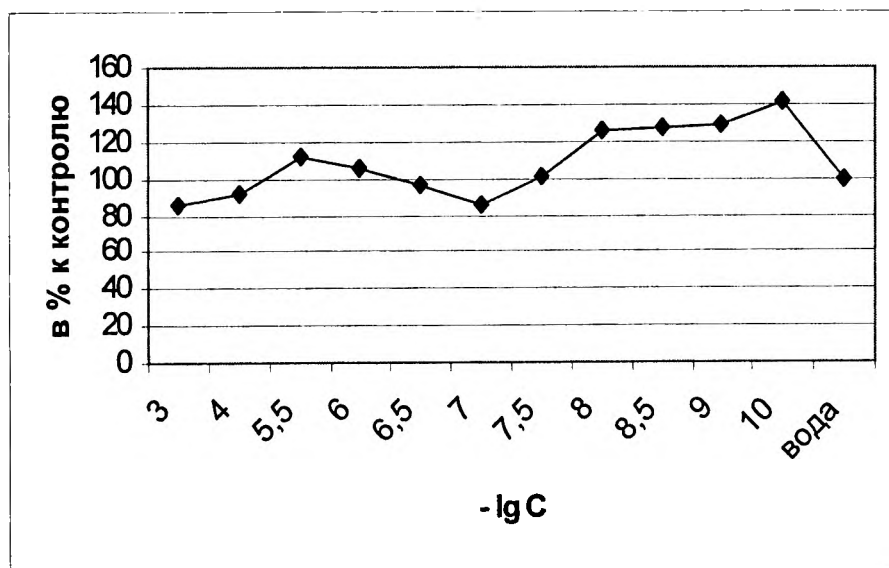


Рис. 3. Влияние ионов меди на накопление флавоноидов в проростках гречихи

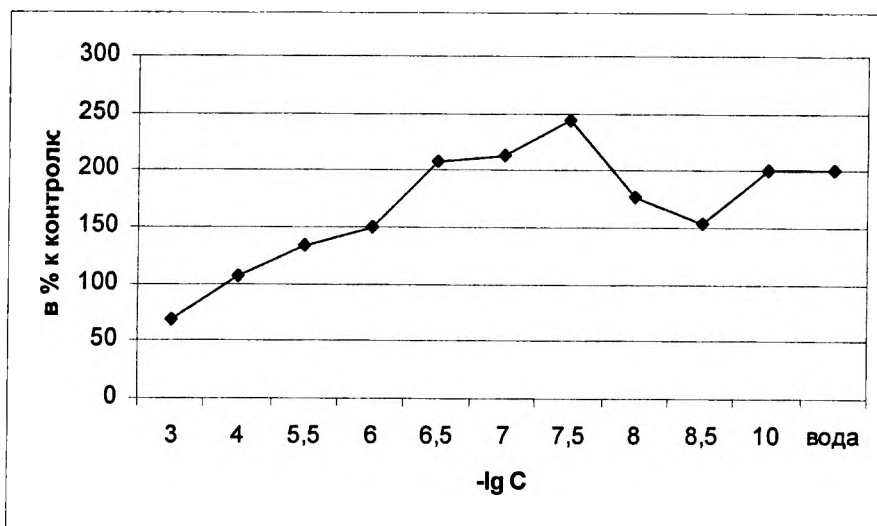


Рис. 4. Влияние ионов меди на рост проростков гречихи

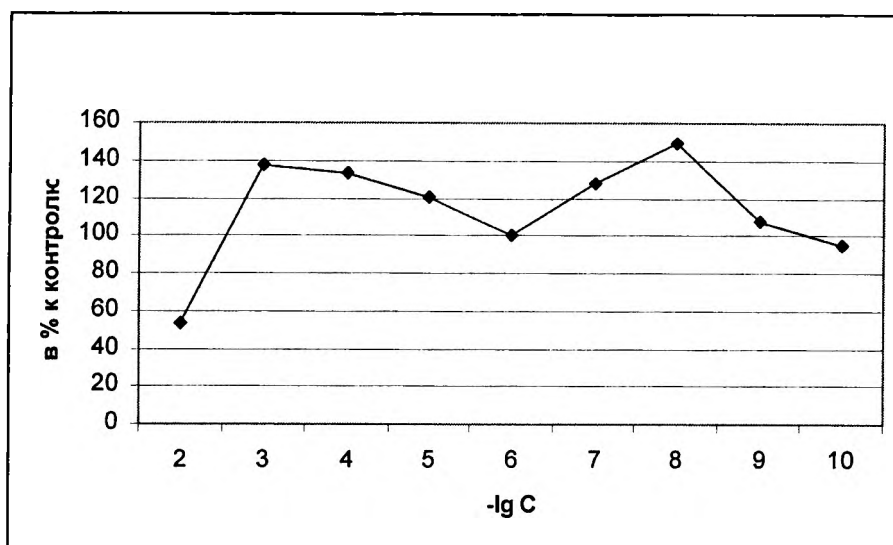


Рис. 5. Влияние ионов цинка на накопление флавоноидов в проростках гречихи

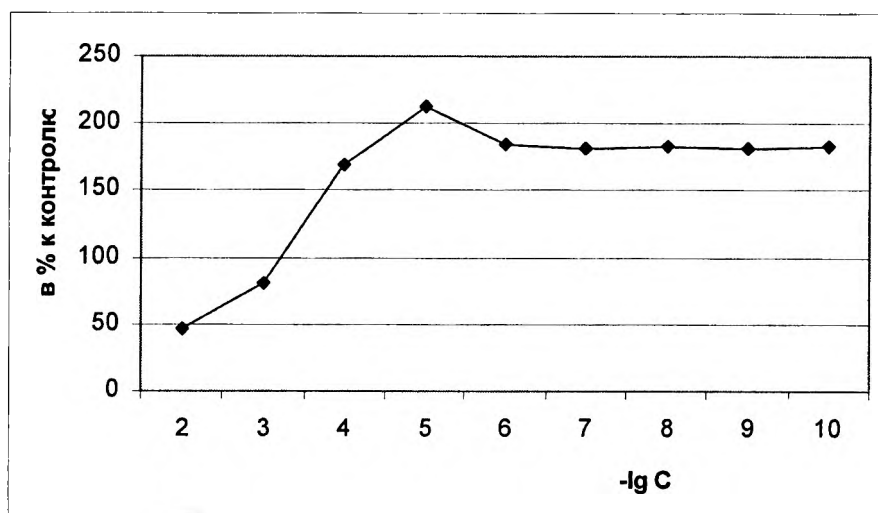


Рис. 6. Влияние ионов цинка на рост проростков гречихи

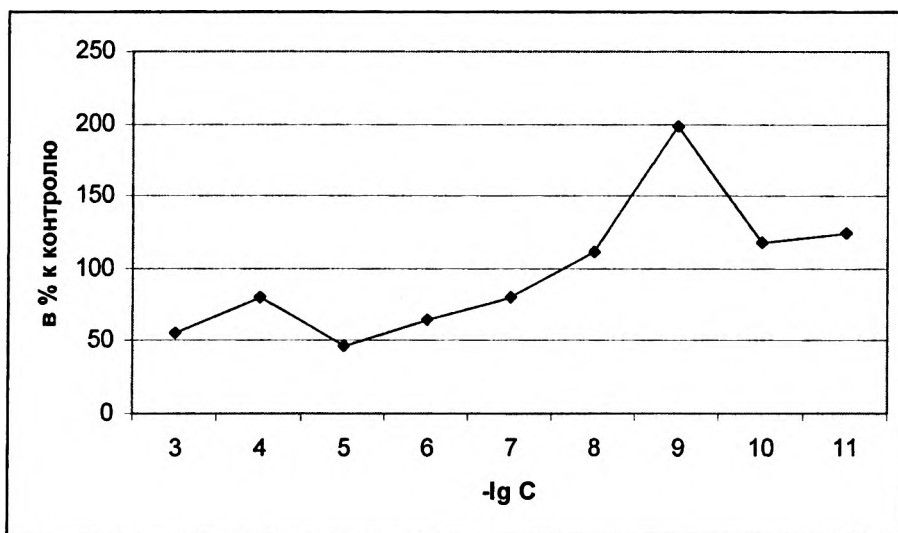


Рис. 7. Влияние ионов железа на накопление флавоноидов в проростках гречихи

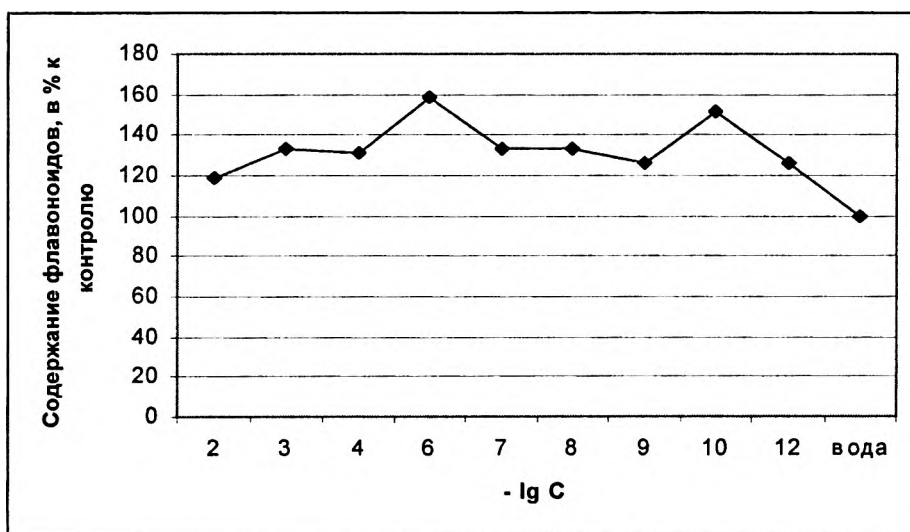


Рис. 8. Влияние ионов марганца на накопление флавоноидов в проростках гречихи

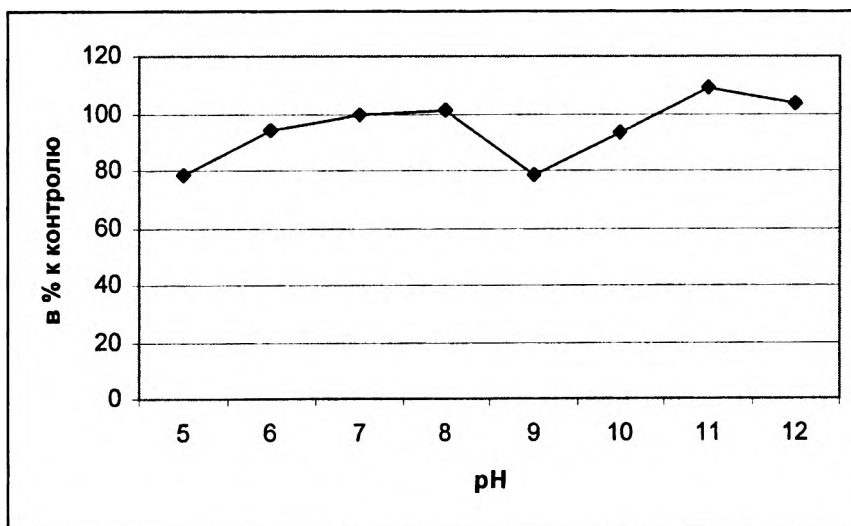


Рис. 9. Влияние ионов водорода на накопление флавоноидов в проростках гречихи

pH среды не оказывает столь значительного влияния на содержание флавоноидов в проростках гречихи. При большинстве изученных значений pH содержание флавоноидов остается близким к контролю, а при pH=5 и при pH=9 накопление флавоноидов угнетается на 20% по сравнению с контролем. Интересно отметить, что даже незначительное смещение pH в кислую сторону приводит к повреждению главного корня проростка. При pH=6 рост побегов практически не страдает в связи с обильным образованием придаточных корней. При pH=5 придаточных корней нет, длина главного корня в среднем составляет всего 3,8 мм (контроль - 36 мм), что говорит о серьезных нарушениях процессов роста избытком водородных ионов. При pH=4 ни одно семя не проросло.

Таким образом, стимулирующий эффект ионов железа проявляется в концентрации 10^{-9} М (увеличение содержания на 60%), ионов марганца - в концентрации 10^{-10} М и 10^{-6} М, ионов цинка - в концентрации 10^{-8} М (увеличение на 50%), ионов меди - в концентрации 10^{-10} М (увеличение на 40%).

ВЫВОДЫ

1. Проростки гречихи можно получить в лабораторных условиях при проращивании семян в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной водой очищенной или растворами микроэлементов в количестве 1 мл на 1 проросток.
2. Кривая роста проростков и содержания в них флавоноидов имеет классическую S-образную форму, причем переход на плато наблюдается на 8-е сутки развития.
3. Зависимость содержания флавоноидов от концентрации микроэлементов во всех случаях выражается двухвершинной кривой. Между максимумами наблюдается прогиб кривой, который соответствует наибольшим размерам проростков.
4. Ионы железа (в концентрации 10^{-9} М), марганца (в концентрации 10^{-10} М и 10^{-6} М), цинка (в концентрации 10^{-8} М) и меди (в концентрации 10^{-10} М) увеличивают накопление флавоноидов в проростках гречихи на 60%, 50%, 50% и 40% соответст-

венно. Влияние pH на содержание флавоноидов незначительно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бузук Г.Н. Регуляция метаболизма алкалоидов в растениях с помощью физиологически активных соединений// Автореф.докт.дисс. - Витебск. - 2001.
2. Гринкевич Н.И., Грибовская И.Ф. Влияние внекорневой подкормки солями микроэлементов на увеличение биомассы, накопление флавоноидов и повышение активности ферментов гречихи окаймленной// Агрохимия. - 1973. - №4. - С. 98-104.
3. Кретович В.П. Биохимия растений: Учеб. - М.:Высш.шк. - 1986. - С.96-160,, 316-325.
4. Ловкова М.Я., Бузук Г.Н., Кузьмичева Н.А. Регуляция накопления алкалоидов в растениях// Природа. - 1985. - N3. - С. 115-116.
5. Jensen R.A. The shikimate/arogenate pathway: link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism// Physiol.Plant. - 1986. - Vol.66. - №1. - P. 164-168.
6. Marziach M., Lam C.H. Polyphenol oxidase from soybeans and its respons to copper and other micronutrients// J.Plant Nutr. - 1987. - Vol.10. - №9-16. - P. 2089-2094.

SUMMARY

*N.A.Kuzmichova, A.V.Rudenko,
E.A.Mozoleuskaja*

INFLUENCE OF SOME MICROELEMENTS ON TSE ACCUMULATION ON TSE FLA- VONOIDS IN TSE BUCKWHEAT HERMS

Dependence of the flavonoids content from concentration of micronutriens is expressed a two-topmost curve. Ions of Cu, Zn, Mn, Fe in optimum concentration increase flavonoids content in sprouts of buckwheat by 40-60 %.
